

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-96998

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)5月15日

C 12 P 21/00
A 61 K 35/74
C 12 N 15/00

7235-4B

7138-4C

7115-4B ※審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 ヒトアポリポプロテインA-I様蛋白の産生方法

⑯ 特 願 昭59-216988

⑰ 出 願 昭59(1984)10月16日

⑱ 発 明 者 寺 西 豊 横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合
研究所内
⑲ 発 明 者 田 中 秀 穂 横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合
研究所内
⑳ 発 明 者 池 田 康 子 横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合
研究所内
㉑ 発 明 者 木 村 昌 子 横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合
研究所内
㉒ 出 願 人 三菱化成工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
㉓ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

ヒトアポリポプロテインA-I様蛋白の産生方法

2 特許請求の範囲

(1) ヒトアポリポプロテインA-I又はそれと同様の生体活性を有するヒトアポリポプロテインA-I様物質をコードするDNAを含有するDNA断片を、発現用ベクターのプロモータの下流に存在するクローニング部位に導入し、ついで上記DNA断片を導入したベクターを宿主微生物に導入して同宿主を培養し、産生する蛋白を取得することを特徴とするヒトアポリポプロテインA-I様蛋白の産生方法。

(2) プロモータがlac Iにより調節可能なものであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) プロモータがtacプロモータであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

(4) プロモータが λ -ラクトマーゼ遺伝子のプロモータであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

(5) クローニング部位が翻訳開始部位の直前に存在するBam HI部位であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

(6) 宿主微生物が大腸菌であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、組換えDNA技術によるヒトアポリポプロテイン(Apolipoprotein A-I)様蛋白の微生物学的産生方法に関する。

(従来の技術)

血漿中に存在する主要な脂質としては、コレステロール、リン脂質、トリグリセリド及び遊離脂肪酸が挙げられるが、このうちの前三者は蛋白と結合して存在する。水に不溶の脂質が可溶化されたこの脂質-蛋白複合体はリポ蛋白と呼ばれ、脂質と蛋白の割合により、種々の重さ

のものを形成する。このリポ蛋白は、球形粒子状の構造をなし、中核部分に極性のないトリグリセリド、コレステロールエステルが存在し、極性のあるリン脂質、遊離コレステロールが蛋白とともに膜層を形成すると考えられている。

このリポ蛋白中に含まれる蛋白は、アポリポ蛋白と呼ばれ、現在10種類以上が知られている。アポリポ蛋白は、リポ蛋白を構成するのに必要であるばかりでなく、リポ蛋白の代謝においても重要な役割を果たす。このアポリポ蛋白のひとつとして、アポリポ蛋白A-Iが知られている。そしてこのアポリポ蛋白A-Iは、レシチンの β 位の脂肪酸を遊離コレステロールに運んでこれをコレステロールエステルに変える酵素であるLpAAT(レシチン・コレステロール・アシル・トランスフェラーゼ)を活性化する働きがあることが知られている。

このアポリポ蛋白A-Iに異常がある場合、種々のリポ蛋白代謝異常をきたし、たと

えば、高脂血症になり、さらに動脈硬化に至る場合が多い。

このような場合、患者に正常なA-Iを投与することにより、正常なアポリポ蛋白A-Iの機能を回復させることができる。

本発明者らは、このアポリポ蛋白A-I^ロの遺伝子を組換えDNA技術により得るために、完全長cDNA断片を得、今後、これを用いてアポリポ蛋白A-Iを産生する本発明方法に到達した。

すなわち、本発明の要旨は、ヒトアポリポ蛋白A-I又はそれと同様の生理活性を有するヒトアポリポ蛋白A-I様物質をコードするDNAを含むDNA断片を発現用ベクターのプロモーターの下流に存在するクローニング部位に導入し、ついで上記DNA断片を導入したベクターを宿主微生物に導入して同宿主を培養し、産生する蛋白を取得することを特徴とするヒトアポリポ蛋白A-I^生の産生方法にある。

(発明の構成)

以下、本発明を詳細に説明する。

まず、本発明において用いるDNA断片は、次のような方法によつて調製される。すなわち、ヒト肝臓切片、小腸上皮細胞、血液中のマクロファージ又は腎臓切片等をグアジニルチオシアネートとともにホモジナイズし、0.01 平衡密度勾配超遠心によつて全RNAを分離する(Chirgwinら、Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979)。

ついで、常法によりこれをオリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーで精製し、ポリ(A)含有RNAを単離する(mRNA原料)。

このmRNA原料より、岡山とBergの方法(Molecular and Cellular Biology, 2, 161-170, 1982)によつて、cDNAライブラリーを得る。すなわち、pBR322とSV40のハイブリッドプラスミドを用いて、ベクタープライマーとオリゴ(dG)テールリンカーを得る。このベクタープライマーと上記mRNA共存下

に逆転写酵素を作用させてcDNAを合成し、その制限酵素Hind IIIで消化し、ついで上記リンカーを用いて環化させる。その後、mRNA部分をDNAで置換して、cDNA断片含有プラスミドを得る。

ついで、常法により、これを大腸菌(Escherichia coli)等をアンピシリン耐性に形質転換する。その後、プローブとして、アポリポ蛋白A-Iのアミノ酸配列101-113位

Trp-Gln-Glu-Glu-Met

に対応する合成オリゴヌクレオチドを用いて、これと相補性のある配列を含むクローンを選択する。こうして得られるクローン中より、適切な制限酵素で切断して、最も長いcDNAが挿入されているプラスミドを有するクローンを選択する。

そのクローンより得られるcDNA断片は、MaxamとGilbertの方法(Methods in Enzymology, 65, 499-560, 1980)によつて塩基配

列が決定される。

本発明方法において発現用ベクターのクローニング部位に導入されるDNA断片は、アポリボプロテインA-1又はアポリボプロテインA-1と同様の生理活性を有するアポリボプロテインA-1様物質をコードするDNAを含むDNA断片である。その一例を第1図に示すが、本発明に係るDNA断片は必ずしもこれと同一の塩基配列を有することを要求されず、該DNA断片に含まれるDNAによつてコードされる物質が、アポリボプロテインA-1と同様の生理活性を有するアポリボプロテインA-1様物質であれば、該塩基配列の一部が置換もしくは削除され、又は塩基が付加された塩基配列であつてもよい。

本発明方法において、上記DNA断片は、発現ベクターの下流に存在するクローニング部位に導入することによつて、これを鋳型とする翻訳によりアポリボプロテインA-1又はアポリボプロテインA-1様物質、あるいはこれを含

ンA-1様蛋白を効率よく発現させることができ、得られる蛋白(アポリボプロテインA-1)を抗原とし、常法により抗血清を得、これを用いてアポリボプロテインA-1の存在を検出できる。

さらに、得られるアポリボプロテインA-1を、抗高脂血症剤、抗動脈硬化剤として用いることもできる。

(実施例)

以下、実施例により、本発明を更に具体的説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り、以下の実施例により限定されない。

実施例1

A 原料DNA断片の調製

- (1) ヒト肝臓切片を液体窒素で破砕した後グアニジウムチオシアネート水溶液を添加しホモジナイズした。得られたホモジネートを、Chirgwinらの方法(Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979)にしたがつて、塩化セシウム平衡密度勾配超遠心によつて全RNA

を融合蛋白を得ることができる。

クローニング部位としては、目的とする異性遺伝子の直接発現を可能とする制限酵素認識部位が挙げられる。具体的には、翻訳開始コドンの直前にあるBan HI部位が好ましく、プロモータ下流にBan HI部位が存在しないときには、合成リンカーにより同部位を形成できる。プロモータとしては、lac Iにより調節可能なものが好ましく、このようなプロモータとしては、~~チアミドグロース誘導子のプロモータ及び~~ trp プロモータ及び trp プロモータと lac プロモータとの融合型プロモータである lac プロモータ(Proceeding of National Academy Science 80 21 (1983) 及び特開昭57-194790号参照)が好ましい。宿主としては、通常大腸菌、たとえばHB101、JM106等を用いることができ、形質転換株の培養、蛋白の取得は、常法によることができる。

(発明の効果)

本発明方法によれば、ヒトアポリボプロテ

インを分離した。ついで、常法によりこれをオリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフで精製し、ポリ(A)含有RNAを単離し、RNA原料とした。

- (2) 一方、岡山とBergの方法(Molecular and Cellular Biology 2, 161-170, 1982)により、pBR322と8V40のハイブリッドプラスミドを用いて、ベクタープライマーとオリゴ(dG)チールリンカーを得た。すなわち、pBR322と8V40(マップユニット0.71-0.86)のハイブリッドプラスミド400 ngを、ウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で制限酵素Epn Iで37℃、4時間消化させた。

ついで、常法によりエタノール沈降によつてDNAを回収し、これをdTTPを含む緩衝液中に溶解し、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを添加して、37℃で30分間反応させて、制限酵素Epn Iの消化部位に約60個のdTチールを付加させ

た後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。ついで、このDNAをウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で、制限酵素Hpa Iにより消化した(37℃、3時間)。大きい方のDNA断片を、アガロースゲル電気泳動により精製し、ガラスパウダー法(Vogelsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 613-619, 1979)によつて回収した。その後、このDNAを0℃でオリゴ(dA)セルロースカラムに付し、水で溶出させた後、エタノールで回収し、オリゴ(dT)テールを有するベクタープライマーを得た。

他方、pBR322とSV40(マプユニット0.19~0.33)とのハイブリッドプラスミド100μgをウシ血清アルブミンを含む緩衝液中で、制限酵素Pst Iにより消化した(37℃、1時間半)。ついで、DNAを回収し、dGTPを含む緩衝液に溶解し、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを添加して、37℃で20分間反

(³²P) dCTP及びターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを含有する緩衝液に溶解し、37℃、10分間反応させ、末端あたりdCMPの10~15の残基を付加させた。ついで、回収したオリゴ(dO)テールプラスミド-cDNA:mRNAを含有するペレットをウシ血清アルブミンを含む緩衝液に溶解し、制限酵素Hind IIIで37℃、1時間消化し、エタノール沈澱により、Hind III消化オリゴ(dO)テールcDNA:mRNAプラスミドを回収した。これを前記(2)で得られたオリゴ(dO)テールリンカーDNAを含む緩衝液に溶解し、65℃、2分間インキュベートし、さらに42℃、30分間保持し、0℃に冷却した。ついで、β-NAD(ニコチンアデニンジスクレチド)存在下、大腸菌(E. coli)DNAリガーゼを加えて、一夜インキュベートした。その後、dATP、dTTP、dGTP、dCTP、β-NAD、E. coli DNAリガーゼ、E. coli DNAポ

リメラーゼ及びE. coli RNase Hを添加して、この混合物を12℃、1時間、次いで室温で1時間インキュベートした後、冷却し、反応を停止させ目的とするcDNA断片含有プラスミドを得た。

(3) 岡山とBergの方法(Molecular and Cellular Biology 2, 161-170, 1982)により、cDNAライブラリーを得た。

すなわち、Tris-HCl(pH 8.3)、MgCl₂、KCl、ジチオスレイトール、dATP、dTTP、dGTP及び(³²P) dCTPを含む水溶液に上記(1)で得られたmRNA 30μgと上記(2)で得られたベクタープライマー10μgを添加して、逆転写酵素の存在下に37℃、20分間、反応させ、プラスミド-cDNA:mRNAを合成し、これをエタノール沈澱しペレット状で回収した。このペレットをOoCl₂、ジチオスレイトール、ポリ(A)、

リメラーゼ及びE. coli RNase Hを添加して、この混合物を12℃、1時間、次いで室温で1時間インキュベートした後、冷却し、反応を停止させ目的とするcDNA断片含有プラスミドを得た。

(4) ついで、このプラスミドを用いて常法により、大腸菌(E. coli)HB 101を形質転換させた。

その後、プロンプとして、アポリボプロテインA-Iのアミノ酸配列108-112位
Trp-Gln-Glu-Glu-Met
に相補性のある14量体の合成オリゴヌクレオチド

5'-GAT-GTC-GTC-GTC-CC-3'
を用いて、Hanahanらの方法(Gene, 10, 63-67, 1980)によつてスクリーニングを行ない、これと相補性のある配列を含むクローンを選択した。約100,000の形質転換体中、約8個のクローンが選択され、これらを数種の制限酵素により処理し、そのうちの2

つのクローンが共通の制限酵素認識部位をもつことが判明した。そのうちで最も大きなクローン p h A I-6 を選択し、このクローンの塩基配列を Maxam と Gilbert の方法により決定した。

第1図は上記クローンの塩基配列決定のために作成した制限酵素切断地図を示す (A T G : 翻訳開始コドン、T G A : 翻訳停止コドン)。また、第2図に上記 D N A 断片の塩基配列及びそれより想定されるアミノ酸配列を示す。

B ヒトアポリポプロテイン A-1 様蛋白の産生

a) 発現プラスミドの構築

i) プラスミド p h A I E-1 の構築 (第3図)

上記 A で得られたプラスミド p h A I-6 を制限酵素 Ban I で部分消化し (37℃、2時間)、さらに制限酵素 Hpa II で消化し (37℃、2時間)、742bp の断片を得る。

通 (37℃、1時間) し、これと前記2つの断片を T4 D N A リガーゼで連結して (15℃、15時間)、プラスミド p h A I E-1 を得る。

ii) 蛋白の産生

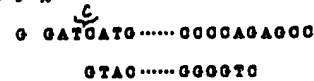
上記プラスミド p h A I E-1 を用いて大腸菌 H B / O / を形質転換し、得られた形質転換株を M 9-0 A 培地で培養し、蛋白を産生させた。電気泳動によりヒトアポリポプロテイン A-1 様蛋白の産生が確認された。

4 図面の簡単な説明

第1図は本発明に係る D N A 断片が挿入されているプラスミドを有するクローンの制限酵素切断地図を示し、第2図 (a, b) は、本発明に係る D N A 断片の塩基配列及びそれより想定されるアミノ酸配列を示す。

第3図は本発明におけるプラスミド p h A I E-1 の構築工程の概略図である。

一方、プラスミド p B R 3.2 を制限酵素 Ola I、Ban H I で消化し (37℃、2時間) 大きい断片を得る (約4000bp)。ついでこれらの二つの断片と合成リンカー



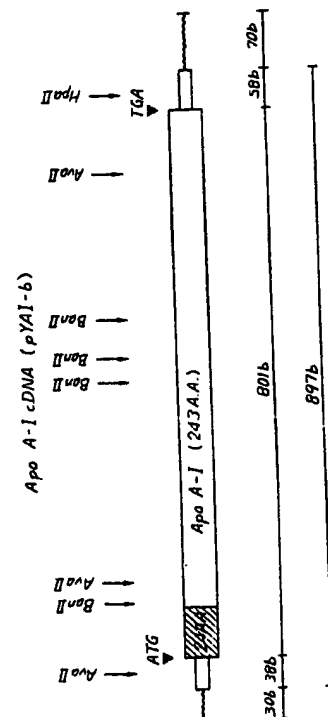
を T4 D N A ポリメラーゼの存在下で連結させ (15℃、15時間)、プラスミド p h A I E-1 を得る (第3図)。

次に、このプラスミドを制限酵素 Eco RI、Ban H I で消化し約1000bp の断片を得る。

一方、プラスミド p D R 3.40 (P.-L B Biochemicals より入手可能) を制限酵素 Eco RI、Ban H I で消化し (37℃、2時間)、tac プロモーター領域を含む約500bp の断片を得る。

つぎに、プラスミド p B R 3.2 を Eco RI 消化 (37℃、2時間)、B A P 処

第1図



図面の添付内容に変更なし)

第 2 図 (a)

..... AGACTGCGAGGAA

GGAGTCCCCACGGCCCTTCAGG ATG AAA GCT GCG GTG CTG ACC TTG GCC GTG CTC TTC CTG ACG GCG AGC CAG GCT CGG CAT TTC TGG CAG CAA
Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln -1

GAC GAA CCC CCC CAG AGC CCC TGG GAT CGA GTG AAG GAC CTG GCC ACT GTG TAC GTG GAT GTG CTC AAA GAC AGC GGC AGA GAC TAT GTG
Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val 30

TCC CAG TTT GAA GGC TCC GCC TTG GGA AAA CAG CTA AAC CTA AAG CTC CTT GAC AAC TGG GAC AGC GTG ACC TCC ACC TTC AGC AAG CTG
Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu 60

CGC GAA CAG CTC GGC CCT GTG ACC CAG GAG TTC TGG GAT AAC CTG GAA AAG GAG ACA GAG GGC CTG AGG CAG GAG ATG AGC AAG GAT CTG
Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu 90

GAG GAG GTG AAG GCC AAG GTG CAG CCC TAC CTG GAC GAC TTC CAG AAG AAG TGG CAG GAG GAG ATG GAG CTC TAC CGC CAG AAG GTG GAG
Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu 120

図面の添付内容に変更なし)

第 2 図 (b)

CCG CTG CGC GCA GAG CTC CAA GAG GGC GCG CGC CAG AAG CTG CAC GAG CTG CAA GAG AAG CTG AGC CCA CTG GGC GAG GAG ATG CGC GAC
Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp 150

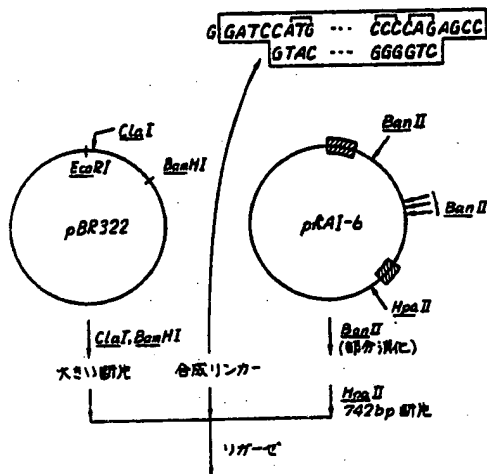
CGC GCG CGC GCC CAT GTG GAC GCG CTG CGC ACG CAT CTG GCC CCC TAC AGC GAC GAG CTG CGC CAG CGC TTG GCC GCG CGC CTT GAG GCT
Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala 180

CTC AAG GAG AAC GGC GGC GCC AGA CTG GCC GAG TAT CAC GCC AAG GCC ACC GAG CAT CTG AGC ACG CTC AGC GAG AAG GCC AAG CCC GCG
Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala 210

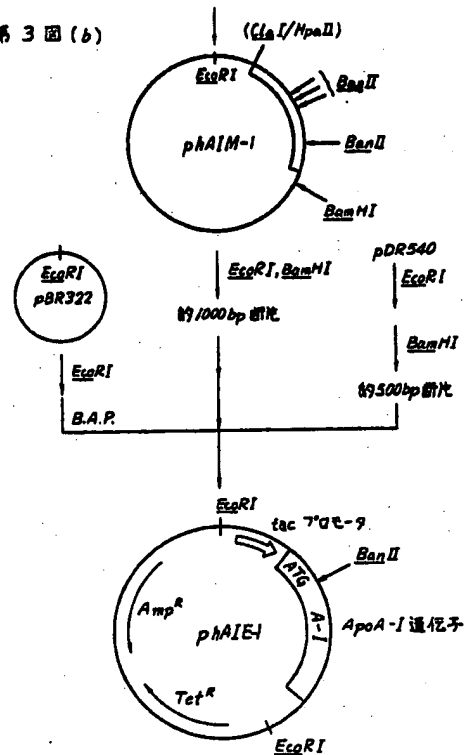
CTC GAG GAC CTC CGC CAA GGC CTG CTG CCC GTG CTG GAG AGC TTC AAG GTG AGC TTC CTG AGC GCT CTC GAG GAG TAC ACT AAG AAG CTC
Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu 240

AAC ACC CAG TGA GCGCGCCGCGCCGCCCCCTTCCCGGTCTCAGAATAAACGTTTCCAAAGTGGGAAAAA
Asn Thr Gln Term

第3図(a)



第3図(b)



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

7138-4C

// A 61 K 37/04
(C 12 P 21/00
C 12 R 1:19)
(C 12 N 15/00
C 12 R 1:19)

特開昭61- 96998(8)

手続補正書(方式)

昭和60年2月18日

特許庁長官殿

1 事件の表示

昭和59年特許願第2168号

2 発明の名称

ヒトアポリボプロテインA-1様蛋白の産生方法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人
(596)三菱化成工業株式会社

4 代理人 千 100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成工業株式会社内

TEL (283) 6976

(6806) 弁理士 長谷川

(ほか1名)

5 補正命令の日付 昭和60年1月29日(発送日)

6 補正の対象 図 面

7 補正の内容 願書に最初に添付した図面(第2図)の
淨面・別紙の通り(内容に変更なし)



以上

手続補正書(自見)

昭和60年2月20日

特許庁長官殿

1 事件の表示

昭和59年特許願第216988号

2 発明の名称

ヒトアポリボプロテインA-1様蛋白の産生方法

3 補正をする者

特許出願人 (596)三菱化成工業株式会社

4 代理人 千 100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成工業株式会社内

TEL (283) 6976

(6806) 弁理士 長谷川

(ほか1名)

5 補正の対象 明細書の図面の簡単な説明の欄(第2図)の
図 面

6 補正の内容

(1) 明細書第17頁下から第5行に「(a, 2)」
とあるのを「(その1、その2)」と訂正する。

(2) 図面(第2図)を別紙の通り訂正する。

以上

第2図(その1)

..... AGACTGCCAGGAA

GGAGTCCCCACGCCCTTCAGG ATG AAA GCT GCG GTG CTG ACC TTG GCC GTG CTC TTC CTG ACG GGG AGC CAG GCT CCG CAT TTC TGG CAG CAA
Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln -1

GAC GAA CCC CCC CAG AGC CCC TGG GAT CGA GTG AAG GAC CTG GCC ACT GTG TAC GTG GAT GTG CTC AAA GAC AGC GGC ABA GAC TAT GTG
Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val 30

TCC CAG TTT GAA GGC TCC GCC TTG GGA AAA CAG CTA AAC CTA AAG CTC CTT GAC AAC TGG GAC AGC GTG ACC TCC ACC TTC AGC AAG CTG
Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu 60

CGC GAA CAG CTC GGC CCT GTG ACC CAG GAG TTC TGG GAT AAC CTG GAA AAG GAG ACA GAG GGC CTG AGG CAG GAG ATG AGC AAG GAT CTG
Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu 90

GAG GAG GTG AAG GCC AAG GTG CAG CCC TAC CTG GAC GAC TTC CAG AAG AAG TGG CAG GAG GAG ATG GAG CTC TAC CGC CAG AAG GTG GAG
Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu 120

第 2 図 (その2)

CCG CTG CGC GCA GAG CTC CAA GAG GGC GCG CGC CAG AAG CTG CAC GAG CTG CAA GAG AAG CTG AGC CCA CTG GGC GAG GAG ATG CGC GAC
Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser, Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp 150

CGC GCG CGC GGC CAT GTG GAC GCG CTG CGC ACG CAT CTG GCG CCC TAC AGC GAC GAG CTG CGC CAG CGC TTG GCG GCG CGC CTT GAG GCT
Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala 180

CTC AAG GAG AAG GGC GGC GGC AGA CTG GCG GAG TAT CAC GCG AAG GCG ACC GAG CAT CTG AGC ACG CTC AGC GAG AAG GCG AAG CCC GCG
Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala 210

CTC GAG GAC CTC CGC CAA GGC CTG CTG CCC GTG CTG GAG AGC TTC AAG GTC AGC TTC CTG AGC GCT CTC GAG GAG TAC ACT AAG AAG CTC
Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu 240

AAC ACC CAG TGA GCGCCCGCGCCGCCCGCTTCCCGTGCTCAGAATAAACGTTTCCAAAGTGGGAAAAA
Asn Thr Gln Term